

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL

Joice Pereira Bomba¹
Simony Pimenta Mascarenhas Cotta²
Ivanildo Evódio Marriel³

RESUMO

As enzimas hidrolíticas desempenham papel importante em diversos processos de interesses biotecnológicos. Dentre esses processos, o uso de biomassa para produção de biocombustíveis, como alternativa às fontes não renováveis, tem despertado grande interesse em virtude das mudanças climáticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e selecionar microrganismos (leveduras, fungos e actinomicetos) produtores das enzimas hidrolíticas amilase, celulase, lipase e xilanase, com potencial para produção de bioetanol e biodiesel. A seleção dos microrganismos foi determinada através do crescimento em meios de cultura com diferentes fontes de carbono (amido solúvel, carboximetilcelulose - CMC, azeite de oliva e xilana) incubados por 10 dias à 28°C, em triplicata. A avaliação da atividade enzimática foi realizada por meio do índice enzimático (IE), sendo classificados como potencialmente produtores aqueles cujo $IE \geq 2,0$. Entre os actinomicetos, observou-se a produção de $IE \geq 2,0$ de amilase em 76,9 % dos isolados testados, 92,3 % avaliados para produção de celulase, 30,8 % para lipase e 7,7 % para xilanase, com valores de IE variando de 2,0 a 5,53. Com relação aos fungos e leveduras notou-se que estes microrganismos foram ineficientes para produção das enzimas hidrolíticas avaliadas, com $IE < 2,0$. Os resultados demonstram o alto potencial dos actinomicetos para prospecção em processos biotecnológicos de interesse para a indústria de biocombustíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Amilase. Celulase. Enzimas Hidrolíticas. Xilanase.

1 INTRODUÇÃO

As fontes energéticas têm papel fundamental na economia de um país e são fortemente dependentes dos combustíveis fósseis. Devido à alta dependência destes, as limitações dessa fonte estão cada vez mais evidentes com a sua atual escassez e esgotamento próximo (GOLDEMBERG *et al.*, 2008). É importante salientar que a queima desses combustíveis pelos meios de transportes estão entre as principais causas das alterações climáticas no nosso planeta com grandes quantidades de gases poluentes como o monóxido de

¹ Bacharel em Biotecnologia pela Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas- MG; e-mail: bomba_joice@hotmail.com.

² Mestre em Biotecnologia e Gestão da Inovação pelo Centro Universitário de Sete Lagoas, Docente da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas-MG; e-mail: spbm@uaivip.com.br

³ Doutor em Agronomia pela USP, Sete Lagoas-MG; e-mail: imarriel@cnpms.embrapa.br

carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e gases sulfurosos emitidos na atmosfera. (DRUMM, 2014).

Diante disso, os biocombustíveis, derivados da matéria orgânica, surgem como excelentes alternativas, com relação à emissão de poluentes na atmosfera, despertando interesse por serem uma fonte de energia de baixo custo, e originando diferentes biocombustíveis, como o bioetanol, o biodiesel e o biogás (ULHOA, 2014; GOMES, 2014). Durante a produção dessas energias renováveis são necessários o emprego de catalisadores de caráter ácido, alcalino ou enzimas de origem microbiana. As enzimas microbianas são mais atrativas, pois minimizam os resíduos gerados durante o processo, são mais estáveis e específicas para o substrato, além de possuírem grande diversidade em propriedades de catálise. As mais utilizadas são: as amilases agindo na quebra das moléculas do amido, celulases hidrolisando a cadeia de celulose, lipase quebrando as moléculas de óleos e gorduras e xilanase com os grupos de polissacarídeos de xilana (SALIHU, 2011).

Este trabalho teve o objetivo de selecionar actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) com potencial biotecnológico para a produção das enzimas hidrolíticas amilase, celulase, lipase e xilanase. Essa seleção foi realizada através do cultivo desses microrganismos em meio sólido para posterior verificação de produção enzimática. Os microrganismos selecionados poderão ser utilizados em testes futuros de produção de biodiesel e bioetanol a partir de diferentes substratos, em substituição aos combustíveis fósseis utilizados atualmente.

2 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, no município de Sete Lagoas, MG. Após a reativação dos microrganismos conservados no glicerol a -20°C e óleo mineral, foram realizadas as análises das atividades enzimáticas. As atividades hidrolíticas das enzimas foram estimadas através do cálculo do índice enzimático (IE), utilizando-se a seguinte equação: $IE = D_h/D_c$, sendo D_h o diâmetro do halo de hidrólise e D_c o diâmetro das colônias dos isolados, no qual é necessário apresentar $IE \geq 2,0$ para ser classificado como potencialmente produtor enzimático.

AMILASE

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por Coon *et al.* (1957). Os isolados foram suspensos em solução salina e inoculados no meio de cultura ágar amido (0,5 g/L de NaCl, 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona caseína, 1 g/L de amido e 15 g/L de ágar) em triplicata. As culturas foram incubadas por 10 dias a 28°C, e em seguida adicionadas de 10 ml de solução lugol diluída (5 g/L de iodo, 10 g/L de iodeto de potássio) em cada placa. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio, com a formação de uma zona amarela ao redor da colônia, em contraste com o meio azul resultante da reação do amido com o iodo.

CELULASE E XILANASE

As atividades celulolíticas e xilanolíticas foram avaliadas de acordo com Lewis (1988) e Heinz (2015) utilizando-se meio de cultura suplementado com carboximetilcelulose (CMC) e xilano como fonte única de carbono (3 g/L de NaNO₃, 1 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,5 g/L de KCl, 10 g/L de FeSO₄.7H₂O, 10 g/L de CMC ou 2 g/L de xilano e 15 g/L de ágar). Os isolados foram suspensos em solução salina, inoculados no meio de cultura e incubados por 10 dias a 28°C. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5 % (m/v) em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos. Em seguida, o excesso da solução foi descartado e adicionou-se 10 mL de solução de NaCl 1 M, deixando-se agir por 30 minutos sob temperatura ambiente. A produção da enzima celulase e xilanase foram detectadas através da descoloração alaranjada ao redor das colônias devido à reação da celulose e xilano com o vermelho congo.

LIPASE

A atividade lipolítica foi testada de acordo com Savitha *et al.* (2007), utilizando-se meio de cultura contendo: 1 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de cloreto de sódio, 15 g/L de ágar, 31,25 mL/L de óleo de oliva, 0,01 g/L de rodamina B. Os isolados foram suspensos em

solução salina, inoculados no meio de cultura em triplicata e incubados por 5 dias a 28°C. Após o período de incubação, os isolados foram expostos a luz ultravioleta para a detecção da formação de halos de coloração azul ao redor das colônias, considerado como parâmetro indicativo da presença da enzima lipase.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 45 isolados avaliados, apenas 13 (28,9%) não produziram nenhuma das enzimas analisadas, sendo esses todos leveduras. Os demais isolados (71,1%) apresentaram resultados positivos para pelo menos uma enzima hidrolítica. As amilases e celulasas foram as enzimas que mais obtiveram isolados produtores com 30 (66,7%) e 26 (58%) isolados positivos, respectivamente. Já as lipases e xilanases apresentaram 7 (15,5%) e 14 (31,1%) dos isolados positivos. O índice enzimático (IE) variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os microrganismos avaliados.

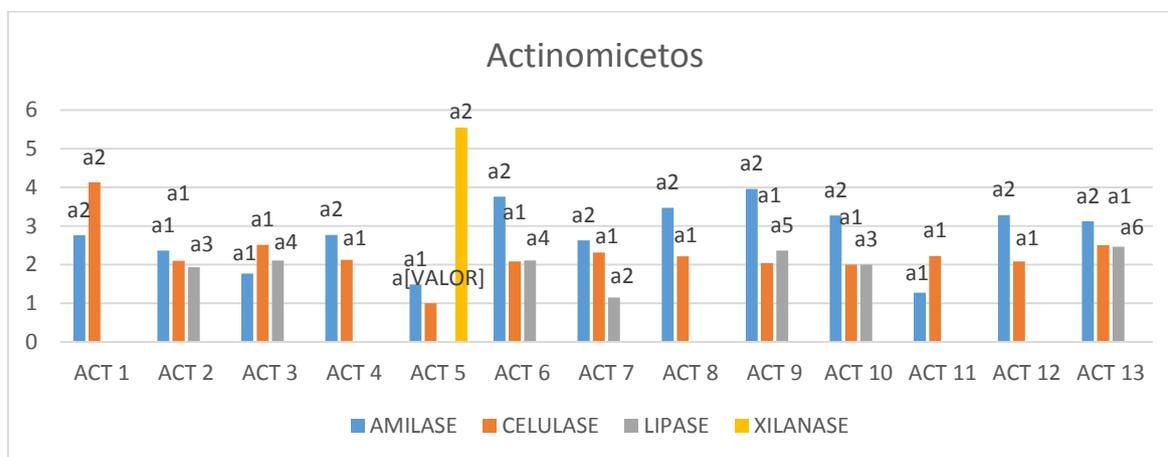


Gráfico 1 – Índice enzimático dos actinomicetos demonstrando diferença significativa por $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Os resultados encontrados para atividade amilolítica dos 13 isolados de actinomicetos foram positivos para a sua maioria, no qual, o ACT9 demonstrou maior IE igual a 3,96 classificando-se com ótimo potencial biotecnológico. Já para a celulase, todos os isolados de actinomicetos foram positivos com maior IE 4,13 para o ACT1 (Gráfico 1). Para a lipase, apenas 6 deles foram positivos, apresentando o ACT13 com valores de IE igual a 2,46. Os resultados encontrados para a xilanase foram negativos em sua maioria, apresentando apenas o ACT5 com maior destaque com IE 5,53.

Nos testes enzimáticos realizados nos 16 isolados de fungos filamentosos para a amilase, os valores apresentados foram positivos para 14 deles, com maior IE 1,16 para o F27. Para a celulase, os valores encontrados foram positivos para 12 dos isolados, no qual F22 apresentou valor de IE 1,4 superior aos demais (Gráfico 2). Já para a lipase, apenas o F29 demonstrou IE positivo igual a 1,12. E para a enzima xilanase, 13 isolados foram considerados como positivos, destes 11 apresentaram valores de IE igual a 1. Os outros dois isolados, F18 e F29 demonstraram valores de IE igual a 1,57 e 1,89 respectivamente. Entre os fungos filamentosos nenhum deles atingiram o valor de IE > 2.

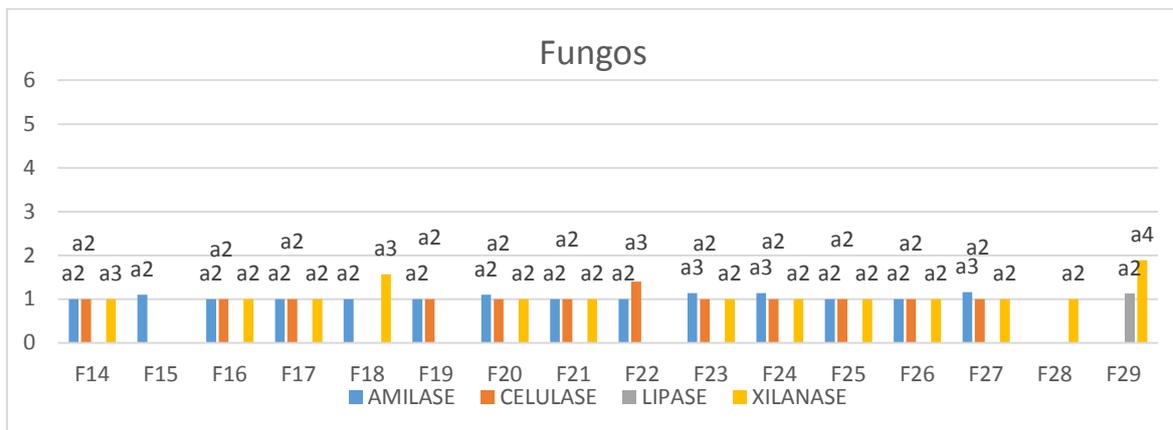


Gráfico 2 – Índice enzimático dos fungos demonstrando diferença significativa por $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Dentre os 16 isolados de leveduras, apenas 3 foram considerados positivos para atividade amilolítica, as leveduras LEV32 e LEV42 apresentaram maiores IE igual a 1,0. Nas enzimas celulases, as leveduras apresentaram valores negativos em 13 dos isolados, onde apenas o LEV42 apresentou resultado positivo com IE igual a 1,65. Nenhum dos isolados das leveduras apresentaram valores de IE > 2.

4 CONCLUSÃO

Através dos resultados alcançados neste trabalho, podemos observar que 32 dos 45 isolados avaliados produziram pelo menos uma das enzimas hidrolíticas analisadas, considerando também que a maioria dos isolados produzem mais de uma das enzimas de interesse. Os actinomicetos foram os microrganismos promissores para a produção enzimática, apresentando os maiores IE. Sendo assim, pode-se sugerir que todos os microrganismos considerados com bom potencial biotecnológico, sejam utilizados para

posterior síntese de biocombustíveis como Biodiesel através das enzimas lipases e Bioetanol por meio das amilases, celulasas e xilanases.

REFERÊNCIAS

CONN, H. J. **Routine tests for the identification of bacteria.** *Manual of microbiological methods*, p. 140-168, 1957.

DRUMM, F. C. *et al.* **Poluição atmosférica proveniente da queima de combustíveis derivados do petróleo em veículos automotores.** *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, v. 18, n. 1, p. 66-78, 2014.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. **Energia, meio ambiente e desenvolvimento.** 2008.

GOMES, K. de S. *et al.* **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.** 2014. f.72. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). UFV. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HEINZ, K. G. H. *et al.* **Avaliação da atividade hidrolítica de micro-organismos isolados de resíduo do processamento de papel.** *Revista de Estudos Ambientais*, v. 16, n. 2, p. 37-47, 2015.

LEWIS, K. J. **Biological control mechanism of the mycoparasitae *Phytum oligandum* Dreschler,** 1988.

SALIHU, A. *et al.* **Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 69, n. 1, p. 66-73. 2011.

SAVITHA, J. *et al.* **Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase.** *African journal of biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 564, 2007.

ULHOA, S. A. **Produção de Biocombustíveis: um panorama sobre o discurso ambiental e econômico.** *Acervo da Iniciação Científica*, n. 2. 2014.